WARNER INSTRUMENTS/ HARVARD APPARATUS

ÍNDICE

1.Materiales.

1.1 Componentes.

1.2 Bomba peristáltica de succión del medio Minipuls Evolution (GILBSON)

2 Metodología.

2.1 Montaje del sistema de perfusión (jeringuillas y tubos)

2.2 Sistema controlador del flujo y su drenaje.

2.3 Montaje de la bomba peristáltica de succión del medio Minipulps Evolution (GILBSON)

2.4 Montaje del dispositivo de sujeción de la muestra.

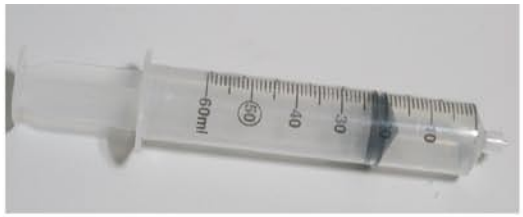
2.5 Experimento.

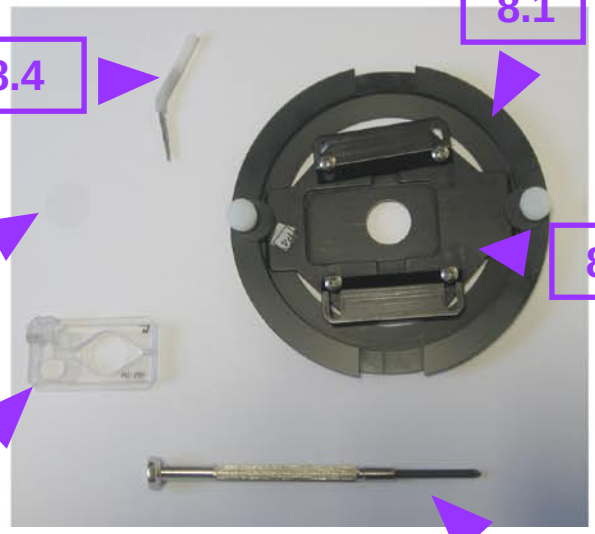
1. MATERIALES.

1.1 COMPONENTES.

Lo que necesitamos para montar el sistema de perfusión abierto es:

1. Brazo sujeta-jeringuillas con 8 adaptadores para sendas jeringuillas.
2. Jeringuillas de 50 ml de volumen.
3. Sistema controlador termostatizado de los medios.
4. Sistema controlador del flujo de los medios.
5. Bomba de succión del medio “Minipuls Evolution (Gilbson)”.
6. Vaso de precipitados o recipiente para recoger los medios celulares.
7. 1 Tubo de plástico sin adaptadores para la salida de los medios.
8. Dispositivo de montaje de la muestra que se compone de varios elementos:
    - **8.1** Base circular metálica negra.
    - **8.2** Base metálica negra.
    - **8.3** Base de plástico blanco.
    - **8.4** Mecanismo de succión del medio del dispositivo de montaje.
    - **8.5** Cubreobjetos de 15 mm de diámetro.
    - **8.6** Destornillador.
9. Pinzas de punta fina.





1

2

3

4

5

6

7

8.1

8.2

8.3

8.4

8.5

8.6

9

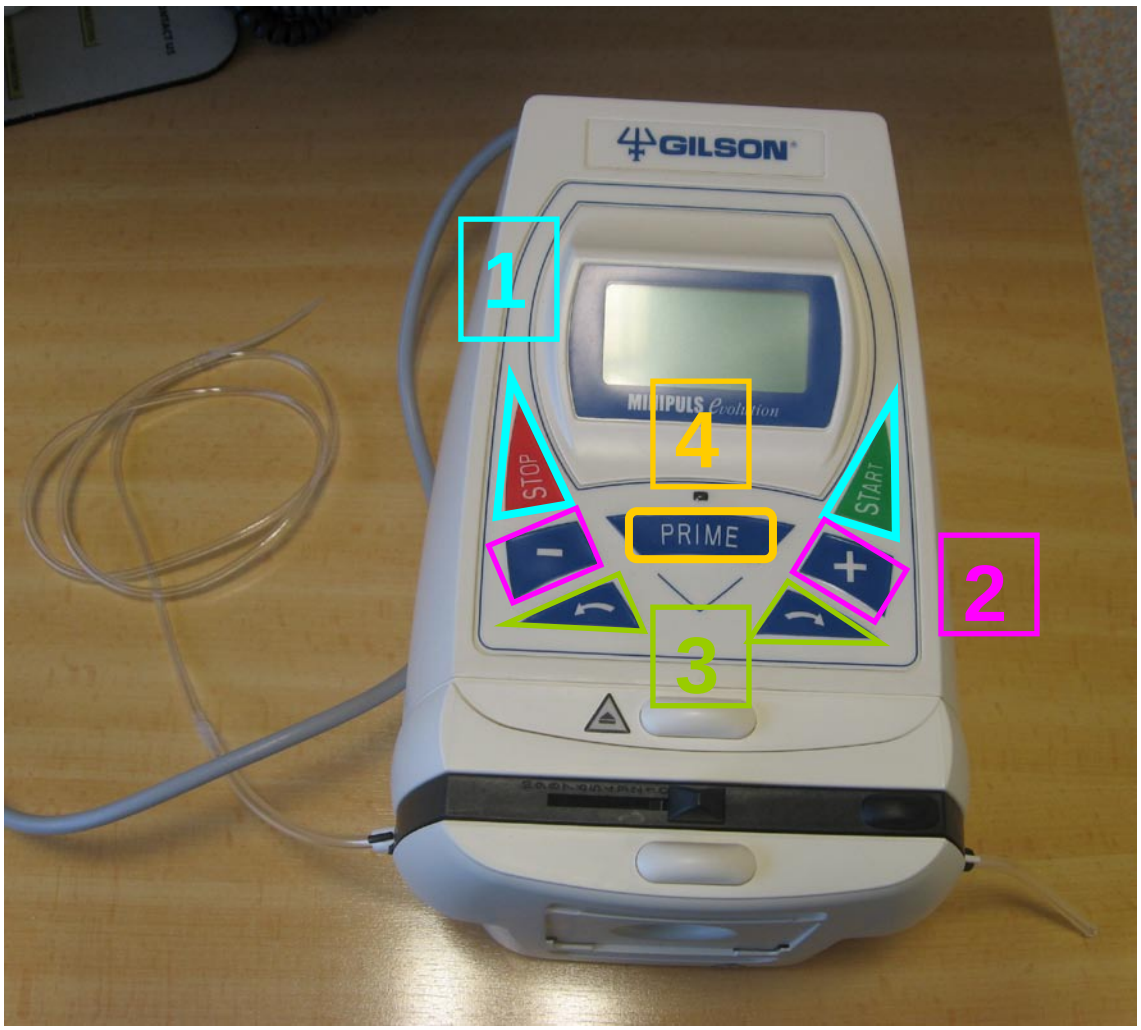
1.2 BOMBA PERISTÁLTICA MINIPULS EVOLUTION (GILBSON)

1. START/STOP: activa/desactiva el motor que permite la succión del medio.

2. -/+: decrece/aumenta la velocidad de succión de la bomba.

3. : selecciona el sentido del flujo de succión.

4. PRIME: aumenta la velocidad de succión al máximo (60 rpm).



2. METODOLOGÍA.

A continuación vamos a explicar el mecanismo de montaje de este sistema de perfusión abierto con varios medios de cultivos.

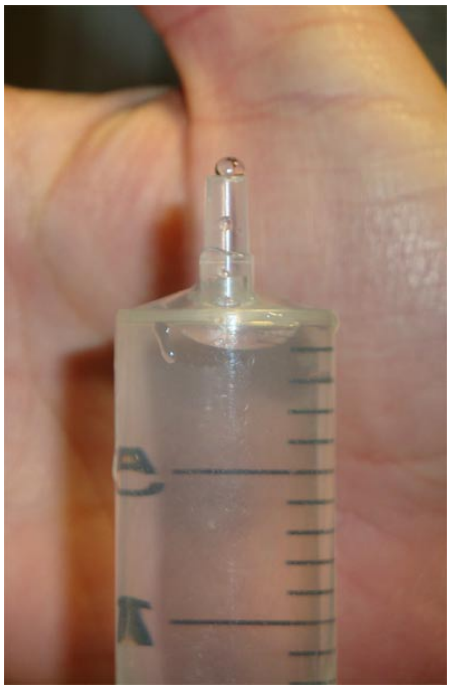
2.1 MONTAJE DEL SISTEMA DE PERFUSIÓN (JERINGUILLAS Y TUBOS)

1. En un vaso de precipitados añadimos el medio con el que queremos rellenar la jeringuilla (en nuestro caso podemos tener hasta un total de 8 medios distintos ya que el brazo posee capacidad para 8 jeringuillas)

2. Echamos un poco hacia atrás el émbolo de la jeringuilla y metemos la punta en el vaso de precipitados. Sin sacar la punta de la jeringuilla del líquido (para evitar lo máximo posible que se nos formen burbujas) vamos absorbiendo, despacito, el medio y rellenando la jeringuilla.

Comprobamos que no haya ninguna burbuja en la jeringuilla porque nos puede dar problemas a la hora de hacer el experimento (para quitar las burbujillas que siempre suelen aparecer podemos orientar la jeringuilla hacia arriba y dar golpecitos al cuerpo de ésta, hasta que las burbujas se queden en la punta, y expulsar un poco de medio con la esperanza de que se lleve las burbujas también)

1



2

3. Colocamos la jeringuilla en uno de los 8 adaptadores que tiene el soporte del pie de jeringuillas. La velocidad del flujo del medio dependerá de la altura a la que situemos el soporte en el que va sujeta la jeringuilla, siendo mayor cuanto más alto lo coloquemos.

4. Repetimos los pasos del 1 al 3 tantas veces como medios tengamos.

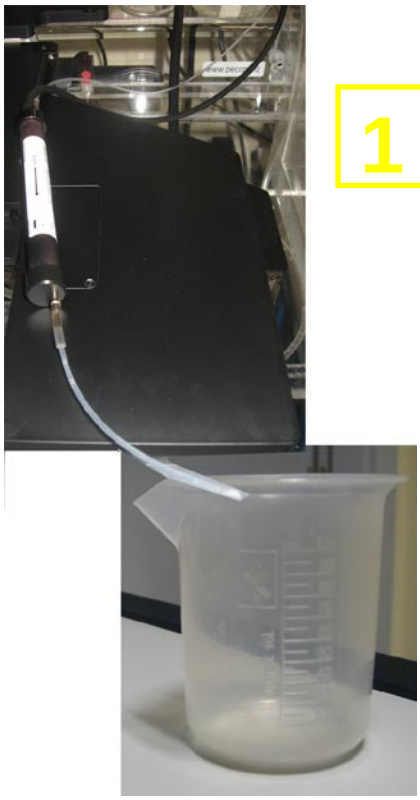
Altura => velocidad flujo

Altura => velocidad flujo

3

2.2 SISTEMA CONTROLADOR DEL FLUJO Y SU DRENAJE.

1. Colocamos un vaso de precipitados al final del tubo donde se unifican los tubos que parten de las 8 jeringuillas para recoger el medio que salga por él.



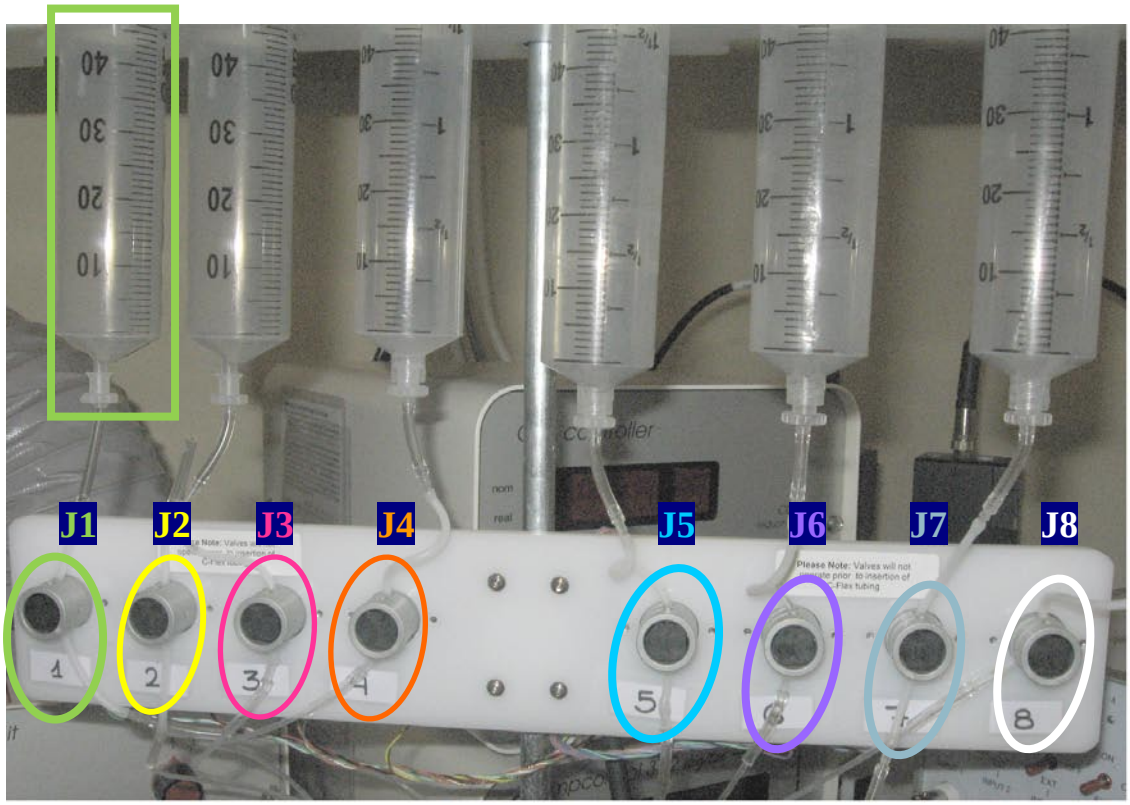
1

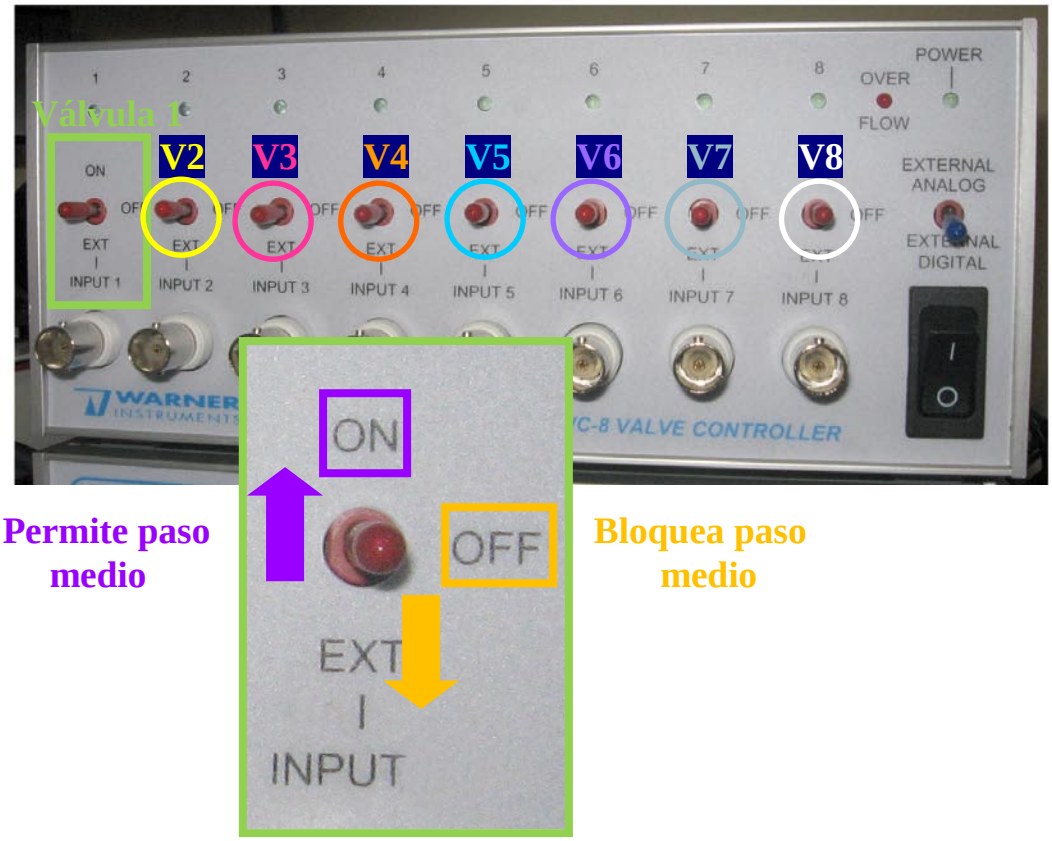
2

2. Encendemos el controlador termostatizado de flujo de los medios y el controlador del paso de éstos presionando sobre los interruptores que se encuentran en la parte delantera.

3. Para empezar con el rellenado de los tubos que salen de cada una de las jeringuillas que vamos a utilizar, subimos de forma consecutiva la palanca que posee cada uno de los ocho adaptadores de jeringuillas en el sistema controlador del flujo de los medios, de tal forma, que al subir la palanca hasta la posición ON del controlador de la jeringuilla número 1 lo que estamos haciendo es permitir el paso del medio de cultivo desde la jeringuilla1 hacía las células. Una vez que hemos comprobado que el medio de la jeringuilla 1 fluye correctamente por el sistema, bajamos su palanca a la posición OFF para cortar el flujo y subimos la de la jeringuilla número 2 para conseguir lo mismo que anteriormente. Realizamos sucesivamente esta operación hasta verificar el correcto flujo de todas las jeringuillas que hayamos colocado en el brazo.
En ocasiones hay que hacer un poco de presión con el émbolo de la jeringuilla para que el medio empiece a fluir.

Jeringuilla 1





Permite paso medio

Bloquea paso medio

2.3 MONTAJE DE LA BOMBA PERISTÁLTICA DE SUCCIÓN DEL MEDIO (Minipuls Evolution)

1. Enchufar el cable gris a la red eléctrica.
2. Encender la bomba pulsando el interruptor de la parte trasera.

2

3. A continuación, seleccionar con las flechas la dirección de succión del medio.

: el medio que se va a eliminar entra por la izquierda y sale por la derecha.

: el medio que se va a eliminar entra por la derecha y sale por la izquierda.

4. Ajustamos la velocidad de absorción del medio pulsando en los botones **-/+** Generalmente se suele utilizar velocidad de 1.00

Entrada del medio
Salida del medio
Salida del medio
Entrada del medio
GILSON
0.60
STOP
rpm
MINIPULS Evolution
STOP
START
PRIME

3

0.60
STOP
rpm
MINIPULS Evolution
STOP
START
PRIME

4

2.4 MONTAJE DEL DISPOSITIVO DE SUJECIÓN DE LA MUESTRA.

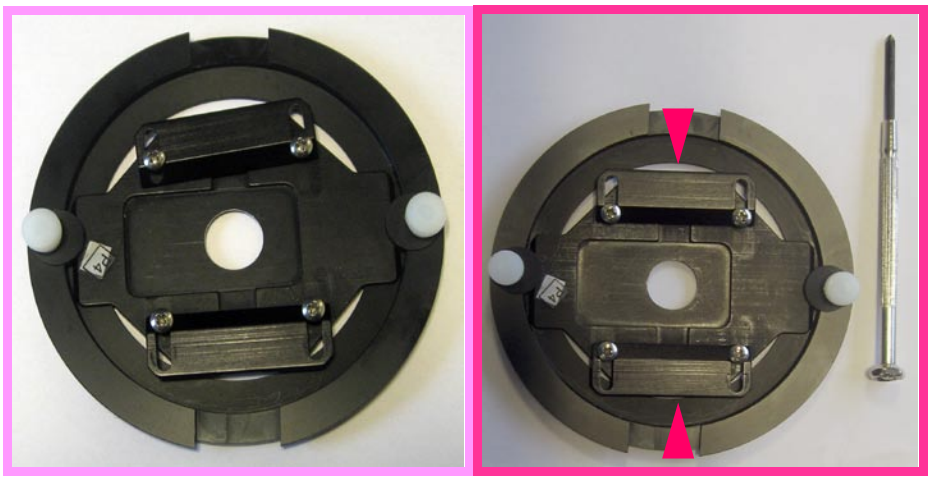
Cuando hayamos drenado el circuito, montado la bomba de succión y comprobado que todo funciona perfectamente podemos montar el sistema donde vamos a mantener a nuestras células (las cuales han sido previamente crecidas en cubres de cristal de 15mm de diámetro)

Para ello:

1. Colocamos sobre la mesa la base metálica negra que ya la tenemos encajada en la base circular metálica negra.

2. Desatornillamos los cuatro tornillos de la base y echamos hacía atrás las barras metálicas (▼)

1

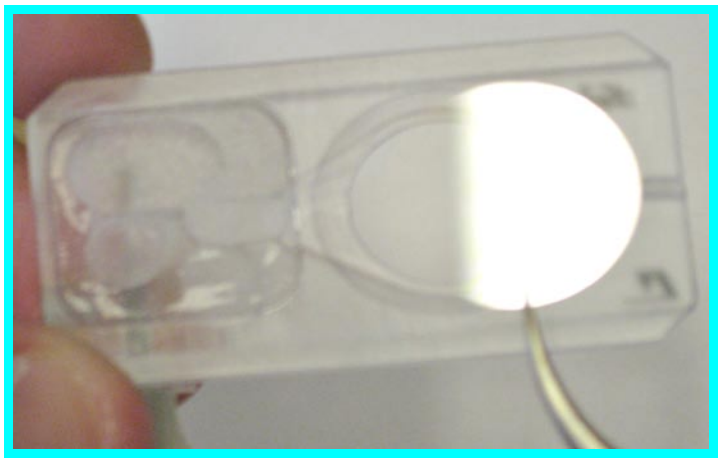


2

3. A continuación, volteamos la base de plástico blanca.

3

4. Ponemos el cubre con las células ligeramente humedecido con el medio sobre la hendidura circular que hay en la base de plástico blanco de tal forma que la capa de células quede en contacto con la base de plástico. Hacemos un poco de presión con las pinzas sobre el borde del cubre para asegurarnos de que se quede bien pegado al soporte de plástico.

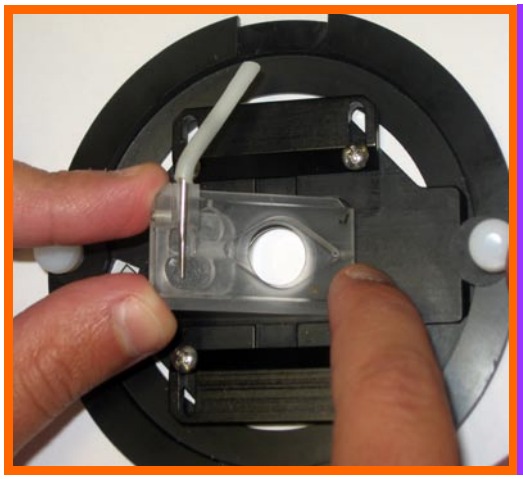


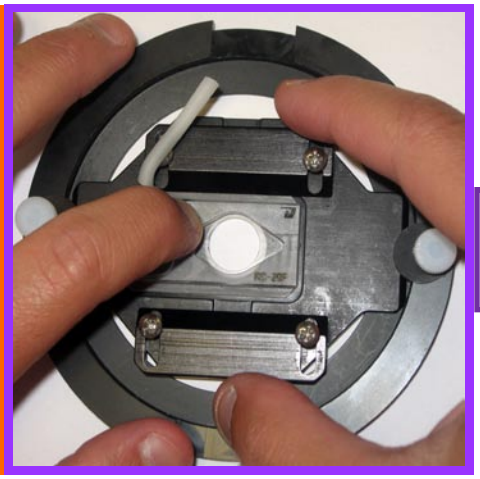
4

5. Volteamos de nuevo el soporte de plástico blanco que ya tiene el cubre pegado en su parte inferior.

6. Apoyamos el extremo del soporte de plástico blanco sobre uno de los extremos de la base metálica negra (hay que tener cuidado de la posición en la que ponemos el soporte de plástico ya que nos tienen que coincidir la circunferencia de este soporte con la de la base metálica negra) y después apoyamos el extremo contrario intentando que sea un movimiento lo más seco posible (pero no brusco) para evitar deslizamientos del cubre.

5





6

7. Con el dedo apoyado en uno de los extremos de la base de plástico seguimos haciendo presión y con los dedos de la otra mano acercamos hacía la base de plástico las barras metálicas hasta que quede el soporte bien encajado entre las barras.

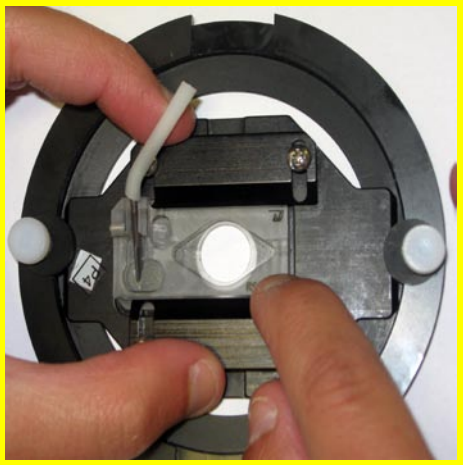
8. Atornillamos los tornillos manteniendo las barras metálicas presionadas hacía el soporte metálico.

9. Pasamos un clínex por debajo del cubre para limpiar el exceso de medio.

10. Añadimos medio de cultivo para mantener vivas a las células y volvemos a pasar el clínex para asegurarnos de que no hay escapes de medio y el sistema está bien montado

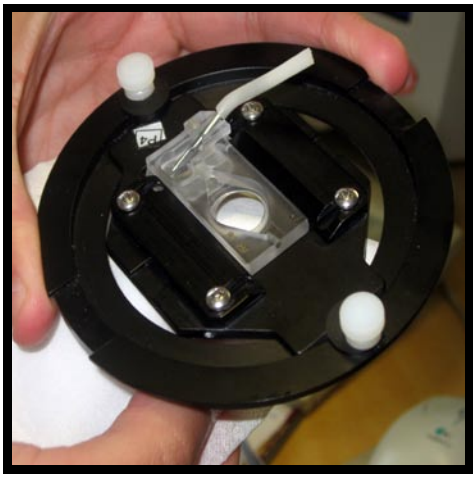
11. Colocamos todo el dispositivo en el microscopio.

7



8

9



10

2.5 EXPERIMENTO.

1. Encendemos el equipo (ver manual del usuario ubicado http://bacterio.cbm.uam.es/confocal/Manuales/Uso%20IN%20VIVO_LEICA.pdf)

2. Encendemos el controlador del sistema de jeringuillas (ver punto 2 del apartado 2.2)

3. Encendemos la bomba peristáltica y la ajustamos (ver apartado 2.3)

4. Rellenar las jeringuillas con los medios correspondientes (ver apartado 2.1)

5. Comenzamos con el drenaje del sistema (ver punto 1 y 3 del apartado 2.2)

6. Montamos el dispositivo de sujeción de la muestra (ver apartado 2.4)

7. Metemos el extremo libre del tubo recolector de los tubos de las jeringuillas en el orificio que hay en el soporte de silicona blanco.

8. Introducimos el extremo del tubo del soporte de silicona blanco en el tubo de entrada del medio de la bomba peristáltica.

9. El extremo del tubo de salida del medio de la bomba peristáltica lo colocamos en un vaso de precipitados para recoger el medio que se desecha.

10. Subimos la palanca a la posición ON del controlador de la jeringuilla en la que tenemos el medio con el cual queremos empezar a realizar el experimento.

11. Apretamos el botón de RUN de la bomba peristáltica para que empiece a succionar el medio.

12. Enfocamos la preparación y ajustamos las condiciones para el in vivo.

13. Cuando queramos cambiar de medio lo que tenemos que hacer será bajar la palanca del controlador de la jeringuilla con la que se esté inyectando medio y subir la de la jeringuilla del nuevo medio que se desea inyectar. Repetiremos esta operación tantas veces como queramos cambiar de medio de cultivo.

14. Una vez que hemos acabado el in vivo recogemos todo el material y lo lavamos con agua MQ.

15. Limpiamos de nuevo el sistema de flujo drenándolo con agua MQ.